

た書式を用いて、各種診断への同意とともに、神経・筋疾患の病態解明と治療法開発研究に対する検体利用に対してインフォームドコンセントを得ている。この同意を得た検体は、国立精神・神経医療研究センター倫理委員会で承認を得た研究に対してのみ使用される。本申請研究についても、採択され次第、国立精神・神経医療研究センター倫理委員会への申請を行う予定である。研究を行う際には、全ての検体は匿名化されて、各種試料は検体番号で管理される。結果の発表に際しても個人情報は一切提示されない。

### C. 研究結果

計 120 例の診断未確定の先天性ミオパチーについて、パーソナル型次世代シーケンサーを用いた変異スクリーニングを行った。その結果、*ACTA1* 変異を 6 例、*NEB* 遺伝子変異を 5 例など。約 1/6 の症例で診断を確定し、約 1/3 で原因遺伝子を推定できた。これは、常染色体劣性の遺伝形式をとる疾患でありながら 1 つの変異しか見いだされず、原因となる遺伝子を推定しえたものの診断の確定に至らなかったものである。原因となりうる遺伝子変化が全く認められないものも複数存在し、未知の疾患原因遺伝子の存在が示唆された。さらに臨床病理学的所見から予測できなかった遺伝子に変異が見いだされる場合もあり、疾患概念の幅が広がる可能性も示唆された。一方で、解析ソフトウェアの不具合やライブラリー作製における問題点などが明らかになり、また、直接シーケンス法による効率的な確認方法の確立などの点について、現在 1 つ 1 つ問題解決を図っている。

### D. 考察

本方法による変異スクリーニングは、ライブラリー作製方法や解析ソフトにより抽出される遺伝子変化群が異なっていることが明らかとなり、より良い方法をさらに検討していく必要がある。また、現行法ではある程度の大きさを持った遺伝子欠失や重複をとらえることができず、片方のアレルにのみ変異が認められた場合の診断に苦慮する例が多い。今後の工夫が必要である。

### E. 結論

パーソナル次世代シーケンサーを用いた既知疾患関連遺伝子の変異スクリーニングは、筋疾患の診断にきわめて有用であるが、まだまだ改善すべき点も多く、経験を積んでいく必要がある。コストパフォーマンスやサンプル量も考慮し、ライブラリーを作製する遺伝子群を取捨選択していく必要がある。

### F. 健康危険情報

なし

### G. 研究発表

#### 1. 論文発表

なし

#### 2. 学会発表

- 1) Hayashi YK: Japanese family phenotypes. NEMALINE MYOPATHY SATELLITE WORKSHOP. Perth, Australia, 10. 14, 2012
- 2) Ishiyama A, Hayashi YK, Kajino S,

Komaki H, Sugai K, Sasaki M, Noguchi S, Nonaka I, Nishino I: Congenital fiber type disproportion with myofibrillar disorganization and altered internal nuclei is caused by RYR1 mutation. The 11th Annual Meeting of the Asian and Oceanian Myology Center. Kyoto, 6. 6-6. 8, 2012

- 3) Ishiyama A, Hayashi YK, Kajino S, Komaki H, Saito T, Saito Y, Nakagawa E, Sugai K, Sasaki M, Noguchi S, Nonaka I, Nishino I: Congenital fiber type disproportion with myofibrillar disorganization and altered internal nuclei is caused by RYR1 mutation. 17th International Congress of the World Muscle Society. Perth, Australia, 10. 9-10. 13, 2012
- 4) Sato T, Hayashi YK, Noguchi S, Osawa M, Nonaka I, Nishino I: DNAJB 6 myopathy in Japanese cohort. 17th International Congress of the World Muscle Society. Perth, Australia, 10. 9-10. 13, 2012
- 5) Sato T, Hayashi YK, Noguchi S, Osawa M, Nonaka I, Nishino I: DNAJB6 myopathy in Japanese cohort. The 11th Annual Meeting of the Asian and Oceanian Myology Center. Kyoto, 6. 6-6. 8, 2012
- 6) 石山昭彦, 林由起子, 小牧宏文, 齋藤貴志, 齋藤義朗, 中川栄二, 須貝研司, 佐々木征行, 西野一三: 内在核と筋原線維間網の異常を有し二峰性筋線維不均等を示す先天性ミオパチーは

RYR1変異が原因である. 第54回日本小児神経学会総会, 札幌, 5. 17, 2012

- 7) 林由起子: 筋ジストロフィー研究の進歩. 東京医科大学総合研究所主催シンポジウム (第12回医学総合研究所セミナー), 東京, 6. 26, 2012

#### H. 知的財産権の出願・登録状況 (予定を含む)

1. 特許取得  
なし
2. 実用新案登録  
なし
3. その他  
なし

厚生労働科学研究費補助金  
(難病・がん等の疾患分野の医療の実用化研究事業(難病関係研究分野))  
分担研究報告書

ミトコンドリアミオパチーの原因解明

研究分担者 後藤 雄一 (独) 国立精神・神経医療研究センター神経研究所 部長  
研究協力者 松本 直道 横浜市立大学 教授  
佐藤有希子 (独) 国立精神・神経医療研究センター病院 遺伝カウンセラー  
竹下 絵里 (独) 国立精神・神経医療研究センター病院 レジデント

研究要旨

ミトコンドリアミオパチーの約60%で原因が確定しておらず、そのほとんどが核DNAにコードされた核遺伝子と予想されている。1500余りのミトコンドリア関連タンパクが同定され、これまでに約200のタンパクの遺伝子に変異が報告されている。このような状況で、次世代シーケンサーで網羅的に原因遺伝子を検索することは研究的、臨床的に意義が高い。今年度は、約800のミトコンドリア関連タンパクをコードする遺伝子配列を調べるために、7368箇所の領域をキャプチャーするHaloplex®を用いた解析を生化学的に呼吸鎖酵素複合体I機能低下症の2症例に試みた。その結果、それぞれに病因の可能性の高い遺伝子変異が、それぞれコンパウンドヘテロ接合体とホモ接合体で見いだされ、病因確定のために表現系回復実験を続行中である。今後はこの方法でさらにミトコンドリア機能異常が確定している症例について解析を行い、原因解明を進める。

A. 研究目的

ミトコンドリアはATPを供給するオルガネラ(細胞内小機器官)で、その機能障害が引き起こす疾患としてミトコンドリアミオパチーがある。ミトコンドリアミオパチー患者はミトコンドリアDNA(mtDNA)もしくは核DNAコードのミトコンドリア関連遺伝子に病因変異を有する。従来分子遺伝学的検査の大部分はmtDNAを対象としているため、核DNAコードの遺伝子に病因変異が確定している症例はそれほど多くない。実際、核DNAコードのミトコンドリア関連タンパク質は1500個以上に及び、それらの遺伝子すべてに疾患の原因があると推定され、今までに約200個の遺伝子に病的変異が同定されているのみである。

現在、ミトコンドリアミオパチー患者の約60%は病因が不明であり、そのほとんどが核DNAに病的変異を有すると考えられている。

本研究ではmtDNAに変異を持たない症例に

ついて、次世代シーケンサーを用いて核DNAコードのミトコンドリア病関連遺伝子の変異を検索する方法を確立し、具体的に病因変異を特定することを目的とする。

B. 研究方法

1. 検体試料

国立精神・神経医療研究センターの筋レポジトリーには、すでに1500近くのミトコンドリアミオパチー患者の登録がある。臨床的に同病が疑われる患者から採取した凍結骨格筋を用いて、病理学的検査を行い、診断結果を担当医に報告するとともに、残余試料を研究に使用している。本研究では、ミトコンドリア病理異常や機能異常が確認され、欠失や点変異などのmtDNAの病的変異が同定されていない患者の筋組織、もしくは血液からのDNAを使用した。また、一部の患者では、筋肉組織より樹立した筋芽細胞を解析に用いた。

## 2. 検体選定

過去 30 年異常の期間に収集した mtDNA に病的変異を持たない患者骨格筋は、おおよそ 1000 検体を保有している。その中で、ミトコンドリア呼吸鎖複合体の活性を測定する生化学検査において呼吸鎖複合体 I の活性が低下している 2 検体を選定した。いずれの患者の両親も血族婚ではなかった。患者 1 は 1 ヶ月の男児で Leigh 症候群を呈し、呼吸鎖複合体 I の活性がコントロールの約 8% に低下していた。患者 2 は 16 歳の男性で高乳酸血症を呈し、呼吸鎖複合体 I の活性はコントロールの 30% に低下していた。

## 3. シーケンス対象領域の選択

現在までにミトコンドリアミオパチーの核 DNA コードの病因遺伝子として報告されている約 200 遺伝子に加え、ミトコンドリア病を引き起こす可能性がある遺伝子として既知の病因遺伝子の類縁遺伝子や、遺伝子カスケードの前後に位置すると予想される遺伝子を選定した。さらに酵母のミトコンドリア関連遺伝子との類似性からミトコンドリアでの機能が予測される遺伝子のうち細胞内局在予測プログラム (Mitoprot) によりミトコンドリアへの局在の可能性が高い遺伝子を加え、合計約 800 遺伝子の 7368 領域をターゲットとした。ターゲット領域の抽出は HaloPlex® ターゲットエンリッチメントシステム (Agilent Technologies 社) を用い、添付のプロトコールに従って行った。

## 4. シーケンス及びその後の解析

次世代シーケンサーは MiSeq (illumina 社) を用いた。データの解析はアメリカ株式会社製のプログラム QCleaner、QMerge を用いて行った。その後の絞り込みは、イントロン領域の除去、同義置換変異の除去、ミスマッピングの除去、リード数が少なく判定不能なデータの除去を行い、公共的な SNP のデータベースを参照するなどして、その作業を行った。

(倫理面への配慮)

国立精神・神経医療研究センター倫理委員会において、骨格筋の診断とその後の研究使

用における研究計画の最初の倫理承認は平成 9 (1997) 年 1 月であり、その後、倫理ガイドラインの改正や当センターにおける骨格筋管理の実態 (培養細胞の追加、骨格筋レポジトリを集中管理するトランスレーショナル・メディカルセンターの開棟など) に合わせ、平成 13 (2001) 年 7 月 19 日、平成 21 (2009) 年 5 月、平成 24 (2012) 年 8 月に倫理委員会から承認を得ている。

## C. 研究結果

### 1. Haloplex®を用いたターゲティング

これまで患者で報告のある 200 近くの遺伝子に加えて、600 近くのミトコンドリア関連遺伝子を調べる目的で、総計 7368 領域をキャプチャーできる用に設計した。僅か 2 例の結果であるが、マッピングされたリード数は全体の 82.3% であった (表 1)。さらに、同一領域がマッピングされた数 (depth) では、50 以上のリード数の領域は、53.9%~54.5%、30 以上のリード数の領域は 64.2%~65.0%、10 以上のリード数の領域は 80.5%~81.5% であり、その後の解析に耐えうる比率であった。

	患者1	患者2
全リードのうち、クオリティ・フィルタリングをパスしたリードの割合	99.4%	99.4%
全塩基のうち、クオリティ・フィルタリングをパスした塩基の割合	99.1%	99.1%
クオリティ・フィルタリングをパスしたリードのうち、マッピングされたリードの割合	82.3%	82.3%
ターゲット領域の数	7368	7368
リードが一本もマッピングされなかったターゲット領域の割合	3.5%	3.7%
10リード以上でカバーされているターゲット領域の割合	81.5%	80.5%
30リード以上でカバーされているターゲット領域の割合	65.0%	64.2%
50リード以上でカバーされているターゲット領域の割合	54.5%	53.9%

表1 マッピングされたターゲット領域とリード数

### 2. 病因候補変異の絞り込み

今回選定した 2 名の患者はともに呼吸鎖酵素複合体 I の活性低下を示しており、患者由来細胞を保有している。7368 の全ターゲット領域で見いだされた変異の数はそれぞれ、6295 変異と 6261 変異であった。そこで、エキソン/スプライシング領域の変異に絞り、同義置換を除き、ミスマッピングの可能性の高いものを除き、リード数が少ないもの (10

程度以下)の者を除くことで、それぞれ241変異、256変異に絞られた(表2)。

サンプル番号	患者1	患者2
年齢・性別	1m Male	16y6m Male
臨床診断	Leigh脳症	高乳酸血症
血族婚	なし	なし
複合体活性 スーパーコンプレックス	8% 60%	20-30% Not tested
解析パイプライン	BWA-GATK	BWA-GATK
キャプチャ方法	Haloplex	Haloplex
ターゲット領域の数	7368	7368
同定された全変異	6295	6261
エクソン/スプライシング領域の変異	1286	1279
同義置換変異を除く	842	821
ミスマッピングの可能性が高いものを除く	292	296
リード数が少なく(10程度以下) 判定不能なものを除く	241	256
SNP登録ありを除く	6	11

表2 同定された変異と絞り込みの状況

さらに、公共的 SNP データベースや HGMD® を用いて、病的変異か SNP かの検討を行った。公共的 SNP データベースで検索すると、患者1については、登録のない変異が6個、患者2については、11個となった。患者1で見いだされた6個の変異は、いずれもヘテロ変異であった。そのうち同一の遺伝子に2つのヘテロ変異が見いだされた複合体Iサブユニット集合に係わる因子をコードする遺伝子Xは病因である可能性がある。また、患者2についてはSNP登録のない変異を11個見だし、そのうちの2個はホモ変異で存在した。この変異をもつ遺伝子はミトコンドリアDNAの翻訳に係わるタンパクをコードしており、病因の可能性はある。

#### D. 考察

ミトコンドリアミオパチーの病因としてすでに報告されている核DNAコードの遺伝子は200近くに昇っている。遺伝子型と表現型の関係は極めて複雑で、臨床症状から調べる遺伝子を選ぶことは困難であるのがミトコンドリア病の特徴である。このような点を考慮すると、多種類のミトコンドリアミオパチー原因核遺伝子を次世代シーケンサーで網羅的に解析することは理にかなっており、すでに欧米でもその戦略での原因遺伝子探索が進められている。

キーとなる問題は、網羅的な解析を行う方法として、エキソーム解析を行うか、有力な遺伝子群

をキャプチャーして解析を行うかの選択である。ミトコンドリア病はそのほとんどがミトコンドリアに関連するタンパク質に原因があると予想され、すでに1500個ほどのミトコンドリア関連タンパク質のデータベースが構築されている。この点を考慮すると、キャプチャー解析を行うことは、次世代シーケンサーから出されるデータを効率的に解析し、病因遺伝子を同定できると考えられる。さらに、この網羅的遺伝子解析を行う前提として、臨床検体を用いた詳細な生化学的検査を行っておくことが可能なため、さらに原因遺伝子の絞り込みが可能になる。

今年度はミトコンドリア関連タンパク質をコードする約800個の遺伝子をHaloplex®を用いたキャプチャー解析の方法を試みた。その結果として、解析を試みた2例において、病因の可能性の高い遺伝子変異を見いだした。

ミトコンドリアミオパチーの病因遺伝子の多くは常染色体劣性の遺伝形式をとる。よって病因変異として可能性の高いものは常染色体のホモ接合体変異、もしくは複合ヘテロ接合体の変異となる。患者1で認められた遺伝子Xのヘテロ接合体は病因となる可能性がある。また患者2においてはmtDNAの翻訳に関連する因子である遺伝子Yに変異を有することからmtDNAの翻訳に異常を生じ、複合体Iに障害をきたした可能性が考えられる。これらの原因遺伝子候補は、現在標準的に用いられているサンガー・シーケンス法にて変異を確認したのち、それぞれのタンパク質の機能解析、複合ヘテロ接合の確認を進めていく予定である。

一方で、今回行ったキャプチャー解析では、ターゲット領域の約0%程度しかシーケンズデータが得られず、さらにターゲット領域はそれぞれの遺伝子の全領域をカバーしているわけではなく、真の原因遺伝子変異を見逃している可能性は常に存在する。したがって、同定された遺伝子変異によるミトコンドリア機能異常の表現型が正常遺伝子の発現で回復するレスキュー実験(表現型回復実験)がきわめて重要になる。その意味で、最初から機能回復実験が可能な患者検体の確保がされていることが必要で、その意味で培養細胞を含めたミトコンドリア病患者の試料が登録されている国立精神・神経医療研究センターの筋レポジトリの持つ意味は大きい。

この点は、今後エキソーム解析やホールゲノム解析が次世代シーケンサーを用いて行われる

ように手法が進化しても、遺伝学的手法だけで病因の確定が困難になることは十分予想できる。したがって、ミトコンドリア機能解析を行う系を確立・運用しておくことが不可欠であり、特に疾患の臨床診断に応用する際には、さらにその重要性が増すと考えられる。

その例として、研究協力者の松本らがエキソーム解析で見いだした新しいミトコンドリアミオパチーの原因遺伝子候補を当研究部で機能解析を行って病因を確定した（論文発表1）。また、別のプロジェクトで行われたエキソーム解析で見いだされた遺伝子変異も同様な解析を行った（論文発表2）。

## E. 結論

本研究はこれまで病因変異の不明であったミトコンドリアミオパチー患者の核DNAコードの原因遺伝子の同定を行うものであり、約800の遺伝子をターゲットしたキャプチャー解析の有用性を示した。今後は機能解析（機能回復実験）が可能な試料をもつ患者を中心に症例を重ねてその研究的意義、診断的意義を検討する。

## F. 健康危険情報

なし

## G. 研究発表

### 1. 論文発表

#### 1) 著書、総説

後藤雄一. ミトコンドリア病、「希少疾患/難病の診断・治療と製品開発」、(株)技術情報協会、東京、pp. 999-1005、2012

後藤雄一. ミトコンドリア病（ミトコンドリア脳筋症）、「すべての内科医が知っておきたい神経疾患の診かた、考え方とその対応」、羊土社、東京、pp. 282-289、2012

後藤雄一. ミトコンドリア脳筋症。「疾患・症状別 今日の治療と看護」、南江堂、東京、pp. 771-773、2011

後藤雄一. ミトコンドリア病の治療と最新ケアの情報. 難病と在宅ケア 18:28-30、2012.

後藤雄一. ミトコンドリア病の解明、生体の科学 63: 440-441、2012

### 2) 原著論文

Miyake N, Yano S, Sakai C, Hatakeyama H, Matsushima Y, Shiina M, Watanabe Y, Bartley J, Abdenur JE, Wang RY, Chang R, Tsurusaki Y, Doi H, Nakashima M, Saito H, Ogata K, Goto Y, Matsumoto N. Mitochondrial complex III deficiency caused by a homozygous *UQCRC2* mutation presenting with neonatal-onset recurrent metabolic decompensation. *Hum Mut* 34:446-452, 2013

Shimazaki H, Takiyama Y, Ishiura H, Sakai C, Matsushima Y, Hatakeyama H, Honda J, Sakoe K, Naoi T, Namekawa M, Fukuda Y, Takahashi Y, Goto J, Tsuji S, Goto Y, Nakano I, and Japan Spastic Paraplegia Research Consortium (JASPAC). A homozygous mutation of *C12orf65* causes spastic paraplegia with optic atrophy and neuropathy (SPG55). *J Med Genet* 49: 777-784, 2012

Kim SJ, Kwon M, Ryu MJ, Chung HK, Tadi S, Kim YK, Kim JM, Lee SH, Park JH, Kweon GR, Ryu SW, Jo YS, Lee CH, Hatakeyama H, Goto Y, Yim YH, Chung J, Kong YY, Shong M. CRIF1 is essential for the synthesis and insertion of oxidative phosphorylation polypeptides in the mammalian mitochondrial membrane. *Cell Metabolism* 16: 274-283, 2012

Sangatsuda Y, Nakamura M, Tomiyasu A, Deguchi A, Toyota Y, Goto Y, Nishino I, Ueno A, Sano A. Heteroplasmic m.1624C>T mutation of the mitochondrial tRNA-Val gene in a proband and his mother with repeated consciousness disturbances. *Mitochondrion* 12: 617-622, 2012

Furukawa R, Yamada Y, Matsushima Y, Goto Y, Harashima H. The manner in which DNA is packed with TFAM has an impact on transcription activation and inhibition. *FEBS OpenBio* 2: 145-150, 2012

## 2. 学会発表

### 1) 国際学会

Goto Y. Mitochondrial disease. Joint Congress of the 12th International Child Neurology Congress and the 11th Asian and Oceanian Congress of Child Neurology, Brisbane, Australia, 5.27-6.1, 2012

Goto Y., Mimaki M, Hatakeyama H, Komaki H, Yokoyama M, Arai H, Kirino K, Suzuki T, Nishino I, Nonaka I. Reversible infantile respiratory chain deficiency: a clinical and molecular study. The 11th Asian Oceanian Myology Center, Kyoto, Japan, 6.7, 2012

Sato Y, Goto Y. Furnishing appropriate information on mitochondrial disease to patients and their families. 62nd Annual Meeting of the American Society of Human Genetics, San Francisco, USA, 11.7, 2012

### 2) 国内学会

佐藤有希子, 後藤雄一: ミトコンドリア病に関する情報ツール作成の試み. 第54回日本小児神経学会総会, 札幌, 5.18, 2012

佐藤有希子, 後藤雄一: ミトコンドリア病に関する情報提供の充実に向けた取り組み. 第36回日本遺伝カウンセリング学会学術集会, 松本, 6.9, 2012

後藤雄一. ミトコンドリアと老化. ART FORUM 2012, 大阪, 8.30, 2012

末岡浩, 佐藤卓, 水口雄貴, 泉陽子, 高橋香織, 佐藤健二, 中林章, 吉村泰典, 後藤雄一. ミトコンドリア遺伝病における着床前遺伝子診断の不効率例に対する新たな対策の必要性. 第57回日本人類遺伝学会, 東京, 10.26, 2012

後藤雄一. ヒトミトコンドリアの特性-ヒト疾患の病態基盤. 第12回日本ミトコンドリア学会, 筑波, 12.21, 2012

## H. 知的財産権の出願・登録状況 (予定を含む)

### 1. 特許取得

なし

### 2. 実用新案登録

なし

### 3. その他

なし

次世代シーケンサーを用いた遺伝性ミオパチーの  
原因解明に関する臨床情報の集積

研究分担者 小牧 宏文 (独)国立精神・神経医療研究センター  
病院小児神経科 医長

**研究要旨** 遺伝性ミオパチーの病因は多因性であり、かつ未だ病因が不明な例も多く存在する。また遺伝性ミオパチーでこれまでに同定されている原因遺伝子の多くが、NebulinやRYR1などの巨大遺伝子であり、例えば原因遺伝子が判明している疾患であっても従来のサンガー法では遺伝子診断を行うことは困難である。我々は臨床医の立場で次世代シーケンサーによる遺伝性ミオパチーの原因解明の基礎となる臨床データの集積を行う。今年度は計画立案と倫理申請を行ったうえで本研究にてデザインしたエクソンキャプチャーチップを用いた既知遺伝子変異の解析を開始した。

A. 研究目的

遺伝性ミオパチーは新生児期より強い呼吸障害、哺乳障害を認め、乳児期早期に死亡する乳児重症型、乳児期より筋緊張低下、発育・発達の遅れなどを示すが、歩行を獲得し、非進行性もしくは緩序進行性の経過を示す良性先天型、ならびに成人発症型に分類できる。しばしば高口蓋、呼吸障害、哺乳障害を認める。骨格筋の病理組織学的特徴から、ネマリニンミオパチー、セントラルコア病、マルチミニコア病、ミオチューブラーミオパチー、中心核ミオパチー、先天性筋線維タイプ不均等症、先天性全タイプ1線維ミオパチー、タイプ1線維優位を示す先天性ミオパチー、還元小体ミオパチー、などに分類される。顔面筋を含む全身の筋緊張低下(フロッピーインファント)、高口蓋、呼吸障害、哺乳・嚥下障害、発育・発達の遅れ、関節拘縮、脊柱異常などを示す。

原因遺伝子として、ACTA1, NEB, TPM2,

TPM3, TNNT1, CFL2, KBTBD13, RYR1, SEPN1, MTM1, DMN2, BIN1, FHL1等が知られている。遺伝性ミオパチーの病因は多因性であり、かつ未だ病因が不明な例も多く存在する。また遺伝性ミオパチーでこれまでに同定されている原因遺伝子の多くが、NebulinやRYR1などの巨大遺伝子であり、例えば原因遺伝子が判明している疾患であっても従来のサンガー法では遺伝子診断を行うことは困難である。我々は臨床医の立場で次世代シーケンサーによる遺伝性ミオパチーの原因解明の基礎となる臨床データの集積を行っていく。その中でも特に今回は骨格筋画像検査を重視して検討する。これまでの研究により、遺伝性ミオパチーの病型毎に骨格筋の障害の選択性(障害の強い筋とそうでない筋が存在すること)のパターンが異なる傾向があることが知られており、鑑別診断や運動機能の解析に役立てられている。また病因となる遺伝子変異の種類と画像所見との間に一定の相関があることが知られている。骨格筋画像解析はその

病態解明の一つのツールとして有用と考えており、多数の症例の画像の集積により病態解明に寄与できる可能性が高い。

## B. 研究方法

**臨床経過：**家族歴、妊娠分娩歴、出生時の状況、合併症状、臨床経過などを網羅的に把握する。

**検査所見：**CK値などの生化学的所見、筋電図、末梢神経伝導検査などの所見を把握する。

**筋病理所見：**筋生検を行なっている場合には病理レポートを参照し、筋病理診断のまとめを把握する。

**遺伝子解析：**すでに遺伝子診断を行なっている場合には、検索した遺伝子名、具体的な変異を把握する。本研究内でデザインしたエクソンキャプチャーチップを用いH24年度は既知遺伝子変異の解析を実施した。

**骨格筋画像検査：**IBISSは(独)国立精神・神経医療研究センターの脳病態統合イメージングセンター(IBC)が独自に開発・提供するオンラインサポートシステムであり、ID・パスワード認証された全国の研究参加施設から連結可能匿名化された脳画像・臨床診断情報を、HTTPS通信を通して収集し、それらの情報を統合的にWeb上で閲覧できるシステムである。研究に必要な画像情報・臨床情報を共有できる安全な仮想空間を構築することが出来る。本研究は、ミオパチーの診断や経過観察などの通常の診療の一環として撮影された骨格筋画像を既存の患者臨床情報とともに収集し、これをIBISS上に構築することにより、本疾患における臨床画像研究を推進するものである。

本研究はIBISS運営推進委員会ですでに承認が得られている。骨格筋画像データは、共同研究者、研究協力者の医療施設において、連結可能匿名化され、個人情報を含まない状態にした上でHTTPS通信を通して収集する。送られた画像および臨床データは、研究代表者によりIBISSにアップロードされる。IBISSは、元画像(DICOMフォーマット)からヘッダを取り除き、画質を落としたJPEG画像に変換して使用するため、他者による論文その他への盗用の防止、データ量を少なくすることによる通信の高速化、そしてDICOMヘッダからの情報流出の防止など、安全性と利便性を重視した技術である。

(独)国立精神・神経医療研究センター病院からIBISSに登録する場合には、個人情報管理担当者により連結匿名化を行ったうえで、その情報は常に鍵のかかった部屋(病院総合医局)でかつ鍵のついたボックス内に保管することとする。

得られた画像データおよび臨床情報は統合的に解析に供される。臨床診断、重症度、原因遺伝子変異の有無とその種類などと画像所見との関連性について検討する。

(倫理面への配慮)

IBISSを用いた画像集積に関してはすでに(独)国立精神・神経医療研究センターの倫理委員会の承認を得ている。

## C. 研究結果

今年度は、国立精神・神経医療研究センター病院にて、筋生検を実施した上で遺伝性ミオパチーと診断した症例45例をIBISSに登録した。このうち先天性ミオパチーとして、最も頻度の高いネマリンミオパチー11例と、先天性筋ジストロフィーで多く認める福山型先天性筋ジストロフィー4例で

の障害筋分布の特徴について検討を行った。

ネマリンミオパチーにおいて、ACTA1 は乳児重症型を呈することが多いことで知られる変異である。ACTA1 変異の骨格筋画像の既報告では、大腿は全体に、下腿は前頸骨筋に変性が強いが、腓腹筋・ヒラメ筋は保存するとされる。しかし、今回登録した ACTA1 変異 3 例は、腓腹筋はやや保たれるもののヒラメ筋は障害されており、大腿もハムストリング優位に脂肪変性を認めた。また、これ以外の責任遺伝子が同定されていないネマリンミオパチーの障害筋の分布を検討したところ、大内転筋が障害されるが長内転筋が保存され、大腿二頭筋と半膜様筋は障害されるが半腱様筋は保存される特徴的な選択性を有する一群 (3 例) をも認めた。

一方、福山型先天性筋ジストロフィーでは、殿筋全体に脂肪変性や筋量低下を認め、大腿では大腿後部の屈筋群の方が変性・筋量低下とも優位であった。薄筋、半膜様筋、縫工筋は比較的保存されていた。下腿では腓腹筋内側頭、外側頭、ヒラメ筋の脂肪変性が著明だが、前面の筋群はいずれも保たれていた。今回の 4 例は、いずれも福山型先天性筋ジストロフィーとして多く認める 3' 非翻訳領域のレトロトランスポゾン挿入変異をホモ接合で認めた症例であった。

#### D. 考察

ネマリンミオパチーの責任遺伝子は多く知られており、病理学的に同じカテゴリーに分類されてはいるが、本来、病態的には異なる疾患が存在する可能性がある。今回の骨格筋画像の解析においても、ネマリンミオパチーとしてすべてに合致するような共通所見は呈していない。変異の確定している ACTA1 変異 3 例や福山型 4 例の骨格筋

画像が示すように、同一遺伝子で類似の筋選択性を示すことは疑う余地がない。しかし、筋選択性は必ずしも既報告と一致するものとは限らず、症例の蓄積のうえ丁寧な解析が必要である。

一方、ネマリンミオパチーとして原因遺伝子が同定されていない中に、共通の筋障害分布を示す一群を見いだしており、同一遺伝子が原因である可能性が非常に高いと考えられる。骨格筋画像診断をもとにした病型分類が、新規候補遺伝子の発見に寄与できる可能性が考えられる。

今年度は、国立精神・神経医療研究センター病院内の症例登録に限られたが、普遍的で正確な概念確立のためには、より多くの症例を蓄積し解析する必要である。次年度は多施設研究へと発展させ、さらなる症例集積に努める。また現時点では、解析にあたり確立された定量法は存在しないが、定量解析法開発を視野に入れ今後の解析をすすめる。

#### E. 結論

本研究は先天性ミオパチーの病態解析を目的とした次世代シーケンサーと骨格筋画像診断を統合解析するものであり独自性が高い。新しい知見を得るべく次年度も研究をすすめていきたい。

#### F. 健康危険情報

なし

#### G. 研究発表

1. 論文発表

なし

2. 学会発表

なし

H. 知的財産権の出願・登録状況（予定を含む）

1. 特許取得

なし

2. 実用新案登録

なし

3. その他

なし

厚生労働科学研究費補助金  
(難病・がん等の疾患分野の医療の実用化研究事業(難病関係研究分野))  
分担研究報告書

次世代型シーケンスデータ解析プログラムの比較検討

研究分担者 本村 和嗣 (独) 国立精神・神経医療研究センター  
トランスレーショナルメディカルセンター  
臨床開発部 室長  
研究代表者 西野 一三 (独) 国立精神・神経医療研究センター  
神経研究所疾病研究第一部 部長

**研究要旨** 次世代型シーケンサーは分子生物学分野に導入され、多岐の解析に用いられている。ただし、ゲノム情報取得後の解析は、(i) 最適な計算科学的手法の未確立、(ii) command line interface (CLI) の煩雑さ、により、研究者にとって障害となっている。今年度、我々は、次世代型シーケンサーを用いた候補遺伝子を抽出する系を構築した。今後、解析プログラムについて、数理統計学的手法を取り入れた解析を追加して検討していきたい。次年度は、NCNP骨格筋レポジトリーより該当する症例の解析を行う予定である。

A. 研究目的

次世代型シーケンサーは分子生物学分野に導入され、多岐にわたって用いられている。従来の分子生物学的手法で莫大な労力と時間を要したものが、次世代型シーケンサーの導入で、大容量のゲノム情報を解析する技術が身近となった。ただし、ゲノム情報取得後の解析は、(i) 最適な計算科学的手法の未確立、(ii) command line interface (CLI) の煩雑さ、により、研究者にとって障害となっている。更に、解析プログラムは日進月歩で開発されており、使用プログラムによっては出力される結果が異なってくる。

遺伝性疾患の原因遺伝子探索は発展著しい研究分野の一つである。本研究では、次世代型シーケンサーによる解析技術を用いて、効率よく原因遺伝子の探索し、疾患の病態の理解を深めることを目的としている。今年度、我々は、異なる解析プログラムを用いた結果について比較検討を行った

ので報告する。

B. 研究方法

(1) エキソーム濃縮

疾患を発症していない健常人を解析対象とする。血液からゲノムDNAを抽出する。3 $\mu$ gのゲノムDNAを200bpsの長さに断片化し、アダプター分子を接合する。エクソンの部分配列DNAをプローブとし、ヒト全エクソームを濃縮した。

(2) HiSeq1000を用いたゲノム情報収集

上記で得られたDNAライブラリーを用いて、ゲノム情報を収集した。今回は予備実験のため、1配列当たりの塩基長は200bpsの設定で解析した。

### (3) バイオインフォマティクスによる解析系

得られたゲノム情報を、信頼度の低い配列を取り除いた。ヒト染色体 DNA の参照配列は、University of California Santa Cruz Genome Browser (<http://genome.ucsc.edu/>) が提供している hg19 を用いた。Burrows-Wheeler Aligner (BWA) を用いて mapping&alignment を行った。次に、picard を用いて冗長性のある配列を取り除いた。SNV の検出同定を (i) SAMtools、(ii) Genome Analysis Tool Kit (GATK) の 2 種類の方法を用いて比較した。annovar を用いて、疾患関連候補遺伝子、変異情報を抽出し、遺伝情報を付加した。Polyphen2, PhyloP, SIFT, Mutation Taster を用いて、予想されるアミノ酸非同義置換またはフレームシフトが、タンパク質の機能にどのような影響を及ぼすかを予想した。

#### (倫理面への配慮)

「ヒトゲノム・遺伝子解析研究に関する倫理指針」を遵守して研究を遂行する。国立精神・神経医療研究センターの筋レポジトリ検体は、検体採取時に、国立精神・神経医療研究センター倫理委員会で承認を得た書式を用いて、各種診断への同意とともに、神経・筋疾患の病態解明と治療法開発研究に対する検体利用に対してインフォームドコンセントを得ている。この同意を得た検体は、国立精神・神経医療研究センター倫理委員会で承認を得た研究に対してのみ使用される。研究を行う際には、全ての検体は匿名化されて、各種試料は検体番号で管理される。結果の発表に際しても個人情報は一切提示されない。

## C. 研究結果

### (1) SAMtools と GATK の比較

参照配列と比較し、エキソン領域に存在し、アミノ酸非同義置換またはフレームシフトを生じる塩基変異は 8847 箇所 versus (vs) 25802 箇所 (SAMtools vs GATK) であった。GATK の方が多い傾向にあった。得られた情報を、dbSNP や 1000Genome 等の公共データベースを用いて比較し、未報告の新規の SNVs のみを抽出したところ、697 箇所 vs 499 箇所 (SAMtools vs GATK) であった。内訳は、アミノ酸非同義置換生じる塩基変異が、285 箇所 vs 389 箇所 (SAMtools vs GATK) であった。また、フレームシフトを生じる塩基変異は、412 箇所 vs 110 箇所 (SAMtools vs GATK) であった。

GATK を用いた解析では、フレームシフトを生じる塩基変異数が少なくなる傾向にあった。

### (2) 参照配列 hg19 と hg19+decoy 配列の比較

次に、我々は、GATK を用いて参照配列を hg19 に decoy 配列を加えた場合の SNVs 数を比較した。decoy 配列は、35.4Mbps 公開されており、リピート配列、染色体 DNA に挿入されている Herpes Virus、EBV のウイルスゲノム配列等である。アミノ酸非同義置換またはフレームシフトを生じる塩基変異は 207871 箇所であった。得られた情報を、dbSNP や 1000Genome 等の公共データベースを用いて比較し、未報告の新規の SNVs のみを抽出したところ、286 箇所であった。内訳は、アミノ酸非同義置換生じる塩基変異が、180 箇所であった。GATK を用いて参照配列を hg19 で解析した場合、389 箇所であった。decoy 配列を用いた解析の方が、少ない傾向にあった。また、フレームシフトを生じる塩基変異は、106 箇所であった。

## D. 考察

一般的に、次世代シーケンサー解析の

問題は、mapping & alignmentである。様々なアルゴリズムのプログラムが開発されている。ただし、高精度の結果を求めるならば大量の配列を解析する必要があるため時間がかかる。逆に、計算処理速度を速めるならば、低精度の結果しか得られず、次世代シーケンサーの結果の検証に労力を要する。現時点で、BWAは高精度で計算処理が速く、よく汎用されているプログラムである。それでも、mismapping & misalignmentはおきる。よって、SNVsの検出同定には、その欠点を補完しうるプログラムを使用する必要がある。今回、我々はSAMtoolsとGATKの2種類で比較した。GATKを用いたほうが、in/del変異の検出が少ない傾向にあった。さらに、参照配列にデコイ配列を加えて解析したところ、SNVsの数が減少した。GATKには、mismapping & misalignmentと考えられる領域、異常にmapされた配列数が多い、または少ない領域を検出することができ、さらにその領域で再mapping & alignmentする機能がある。これにより、SAMtoolsよりも、信頼性の高い結果が得られると考えられる。しかし、偽陰性も生じている可能性もあるため、今後、統計学的検証を考慮するプログラムを導入する必要があるかもしれない。更に、参照配列hg19にdecoy配列を加えたものを使うことで、より精度の高いmapping & alignmentが得られると期待できる。

我々が構築した系を用いて、tubular aggregatesを伴う肢帯型筋ジストロフィーと診断されたサウジアラビア人一家系について全エクソーム解析し、原因遺伝子探索を行った。本症例では2種類の候補遺伝子が抽出された(data not shown)。そのうちの1種類は、既に、tubular aggregatesを伴う遺伝性筋疾患の原因遺伝子として近年報告されており、本症例においても関与している可能性が高いと考えられる。参照配列をhg19+decoy配列を用いて、BWA-picard-GATK-annovarの解析パイプラインで、効率よく、信頼性の高い結果が得られたと考えている。

## E. 結論

我々が構築した系では、約30候補遺伝子まで絞り込むことがわかった。これらの数の遺伝子の機能解析、変異導入解析は、時間的、人的にかなりの労力となる。今後、情報科学、計算科学等の最新の技術を取り入れて、解析の効率化を試みる必要がある。

## F. 健康危険情報

なし

## G. 研究発表

### 1. 論文発表

なし

### 2. 学会発表

1) 本村和嗣、林由起子、野口悟、内海貴夫、森澤学、西野一三、“次世代型シーケンサーを用いた遺伝性筋疾患の病態解明の試み” 第二回 NGS 現場の会 2012. 05. 24, 大阪

2) 内海貴夫、森澤学、本村和嗣、西野一三、“次世代シーケンサーを用いた遺伝性疾患の原因遺伝子の探索法について 1” 第二回 NGS 現場の会 2012. 05. 24, 大阪

3) 森澤学、内海貴夫、本村和嗣、西野一三、“次世代シーケンサーを用いた遺伝性疾患の原因遺伝子の探索法について 2” 第二回 NGS 現場の会 2012. 05. 24, 大阪

## H. 知的財産権の出願・登録状況（予定を含む）

### 1. 特許取得

なし

### 2. 実用新案登録

なし

### 3. その他

なし

### Ⅲ. 研究成果の刊行に関する一覧表

研究成果の刊行に関する一覧表

書籍

著者氏名	論文タイトル名	書籍全体の編集者名	書籍名	出版社名	出版地	出版年	ページ
<u>後藤雄一</u>	ミトコンドリア病		希少疾患/難病の診断・治療と製品開発	(株) 技術情報協会	東京	2012	999-1005
<u>後藤雄一</u>	ミトコンドリア病 (ミトコンドリア脳筋症)	大生定義	すべての内科医が知っておきたい神経疾患の診かた、考え方とその対応	羊土社	東京	2013	282-289
<u>後藤雄一</u>	ミトコンドリア脳筋症		疾患・症状別—今日の治療と看護	南江堂	東京	2013	771-773

雑誌

発表者氏名 (研究分担者名にはアンダーライン): 論文タイトル名. 発表誌名 巻号: ページ, 出版年
1. <u>Matsuda C</u> , <u>Miyake K</u> , <u>Kameyama K</u> , <u>Keduka E</u> , <u>Takehima H</u> , <u>Imamura T</u> , <u>Araki N</u> , <u>Nishino I</u> , <u>Hayashi YK</u> : The C2A domain in dysferlin is important for association with MG53 (TRIM 72). PLoS Curr. 4:e5035add8caff4. Nov, 2012

#### IV. 研究成果の刊行物・別刷

## 第6章：神経・筋疾患の医療ニーズ

### 第11節 ミトコンドリア病

後藤雄一

(独)国立精神・神経医療研究センター

(株)技術情報協会

『希少疾患/難病 の診断・治療と製品開発』 抜刷

## 第11節 ミトコンドリア病

### 1. 疫学

ミトコンドリア病の臨床的特徴は多様性である。ミトコンドリアは細胞内に存在しエネルギー産生を担っているため、その機能低下は細胞の機能低下や細胞死をもたらす。ミトコンドリアはあらゆる細胞に存在するので、エネルギーを多量に必要とする神経細胞、心筋細胞、骨格筋などに加えて、ホルモン分泌細胞、血管細胞なども障害されることで、まさにあらゆる臨床症状を引き起こす可能性がある。したがって、ミトコンドリア病の診断は症状から見極めることは難しく世界的に定まった診断基準もない。

そのためにミトコンドリア病の正確な有病率を求めることは難しく、典型的な病型や代表的な遺伝子変異の頻度などの統計が断片的にあるのみである。ミトコンドリア病の頻度は、10万人あたり9.2～16.3人とされ、最も頻度の高い遺伝子変異である3243変異による典型的な症状を示すのは10万人あたり3.7人という報告がある。また3243変異は糖尿病・難聴という臨床病型をとることがあり、糖尿病患者の約1%で認められることが日本ばかりでなく欧米各国から報告されている。

我が国ではミトコンドリア病患者数の大規模な疫学調査はされておらず、厚生労働省のミトコンドリア病研究班では独自の診断基準をもとに調査することを計画している。

### 2. 発症機序・病態

ミトコンドリア病を理解するには、ミトコンドリア異常を解剖学的な種々のレベルに分けて考える必要がある(図1)。

DNAレベルでは、核DNA変異とミトコンドリアDNA異常とがある。核DNA上には、おおよそミトコンドリアに関連するタンパクをコードする1500種類の遺伝子があるとされており、今までのところヒトの病気に関連する100種類以上の原因遺伝子が同定されている。さらに、最近の次世代シーケンサーによる検索で新たな原因遺伝子が次々と判明している。

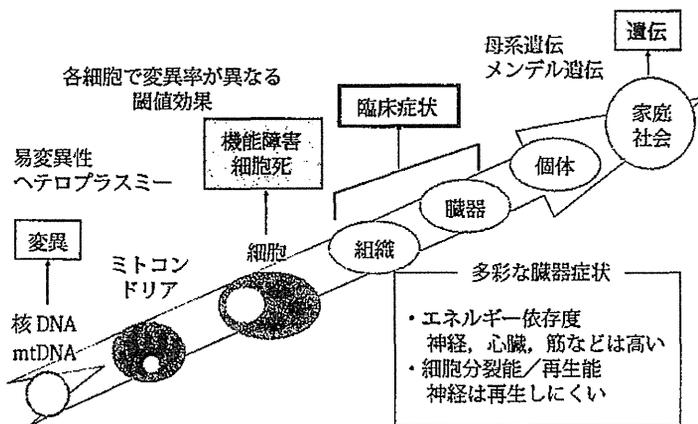


図1 ミトコンドリア異常と解剖学的レベル

一方、ミトコンドリアDNAは核DNAと異なり、細胞質に存在するミトコンドリア内にあり、1ミトコンドリア内に5～10コピー、1細胞内では数千コピー存在する。核DNA上の遺伝子が、父由来、母由来の2コピーしか存在しないことと大きく違っている。この違いは、ミトコンドリアDNA異常の特徴に反映され、ミトコンドリア病患者ではミトコンドリアDNAの量が減少する場合(ミトコンドリアDNA欠乏症候群)と、ミトコンドリアDNAの欠失/重複や点変異などの質的变化を認める場合がある。その際、欠失/重複の場合と点変異の一部は、1細胞内に野生型と変異型が混在する状態(ヘテロプラスミーという)で存在する(図2)。

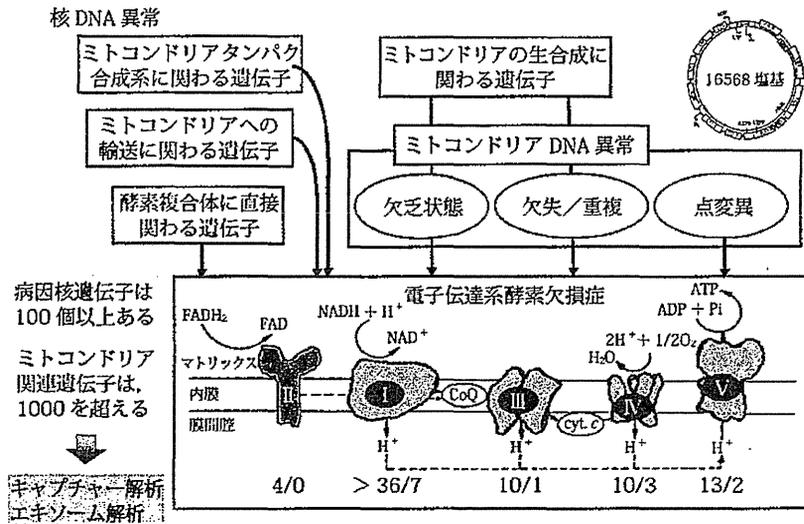


図2 ミトコンドリア病の原因

ミトコンドリアレベルの変化は、形態学的な変化として捉えられる。ヒト疾患では、主に骨格筋を用いて研究されてきたが、ミトコンドリアの数が増加し、大きさが増し（巨大化）、内部構造の変化（クリスタの増殖、封入体など）を認める。骨格筋のように融合して存在する組織の場合は、このような形態変化が同定できるが、神経細胞や血液細胞などのように単独で存在している細胞はミトコンドリア異常があると細胞死に陥り、ミトコンドリアレベルの変化が捉えられないことが多い。

またミトコンドリアの生物学的役割はエネルギー産生がもっとも重要であることは疑いないが、それに加えて、活性酸素の発生、アポトーシスへの関与、細胞内カルシウムイオン濃度調節、感染防御などの様々な機能もある。ミトコンドリア病において、エネルギー代謝障害以外のこれらのミトコンドリア機能がどのように変化しているかは解明されているとは言えない。エネルギー産生だけ改善させても症状がよくなるかどうかについては、今後の病態研究、治療研究において追求すべき問題である。

細胞レベルのミトコンドリア異常は、細胞の機能障害と細胞死としてみられる。ヘテロプラスミーのミトコンドリア DNA 変異でおきる病態の場合、細胞毎に変異率が異なることが知られており、さらに変異率がある値（閾値）以上にならないと細胞機能障害がおきない。また細胞分裂ごとに変異率が変化してゆくことも知られており、分裂増殖する細胞では変異率が変化する。

したがって、組織・臓器レベルでみると、変異率の高い細胞が集まっている組織や臓器で臨床症状が出現すると考えられる。個々の症例で変異率の高い細胞の分布がどのようになっているかは把握できず、予後の予測は困難である事が多い。またこの組織・臓器ごとの違いにより、臨床症状が大きく異なるになる。この性質がミトコンドリア病でみられる、いかなる症状、いかなる年齢、いかなる臨床経過をも示す「臨床症状の多様性」の根拠となっている（図3）。

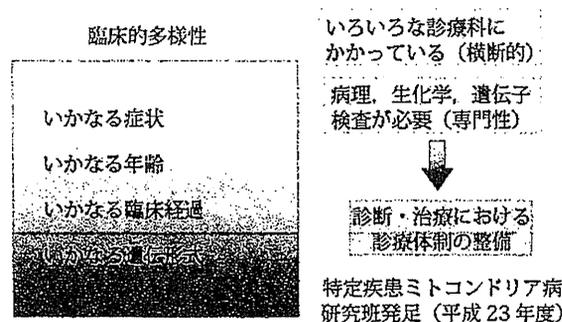


図3 ミトコンドリア病の臨床的多様性